

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA

E.A.P. DE TECNOLOGÍA MÉDICA

**Desempeño de cinco métodos fenotípicos para la
detección de metalobetalactamasas en bacilos gram
negativos tipificados genotípicamente**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Licenciado en Tecnología
Médica en el área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica

AUTOR

Katherine Silvia Yauri Condor

ASESORES

William Henry Roldán Gonzáles

Edgar Gonzales Escalante

Lima - Perú

2016

AGRADECIMIENTO:

A Dios, a mi familia y a mis amigos por su apoyo y motivación incondicional. A mis asesores y mis profesores por su guía y apoyo. A la Dra. Patiño, Jefa del Servicio de Microbiología de INSN, a todos los licenciados y personal del Servicio de Microbiología por su apoyo en el desarrollo del presente proyecto y durante toda mi carrera.

DEDICATORIA:

A Dios, a mis padres y a mis hermanas
por apoyarme siempre a lo largo de mi
vida.

INDICE GENERAL

	página
INDICE	4
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN	7
CAPITULO I: MARCO TEÓRICO	10
1.1. Bacterias Gram negativas	10
1.2. Mecanismos de resistencia	11
1.3. Betalactamasas	12
1.4. Carbapenemasas	12
1.5. Metalobetalactamasas (MBL)	13
1.6. Detección fenotípica de metalobetalactamasas	14
CAPITULO II: MATERIALES Y MÉTODOS	19
2.1 Tipo de investigación	19
2.2 Población	19
2.3 Muestra	19
2.4 Procedimientos	19
2.5 Análisis de los datos	24
2.6 Consideraciones éticas	24
CAPITULO III: RESULTADOS	25
CAPITULO IV: DISCUSIÓN	34
CAPITULO V: CONCLUSIONES	39
CAPITULO VI: RECOMENDACIONES	41
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA	42

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar el desempeño de cinco métodos fenotípicos para la detección de metalobetalactamasas (MBL) en bacilos Gram negativos, se realizó un estudio observacional, descriptivo y de corte transversal. Se incluyeron 100 aislamientos de bacilos Gram negativos tipificados genotípicamente en estudios preliminares. Los métodos evaluados fueron: Prueba de discos combinados con inhibidor (EDTA), Prueba de sinergia de doble disco, Test de Hodge Modificado (cepa *E. coli* ATCC 25922), Test de Hodge Modificado (cepa *K. pneumoniae* ATCC 700603) y Blue Carba Test. De los 32 aislamientos productores de MBL, 27 fueron del tipo IMP, 3 del tipo VIM y 2 del tipo NDM. De los 68 aislamientos no productores de MBL, 66 fueron aislamientos no poseedores de MBL, 1 del tipo CTX + impermeabilidad y 1 aislamiento del tipo. El Método de discos combinados con inhibidor y el Método de sinergia de doble disco demostraron ser los más específicos (100%) y el Blue Carba Test el más sensible (100%). Respecto a los discos de EDTA se encontró un índice Kappa de 1.0 entre los discos comerciales y los discos in-house, es decir una concordancia perfecta. En conclusión, los cinco métodos presentaron un buen desempeño para la detección de MBL. Se recomienda la implementación de un método fenotípico para la detección de MBL en los laboratorios clínicos de rutina. El método debe ser elegido según costo-beneficio de acuerdo a las características de la cepa MBL prevalente.

Palabras clave: Metalobetalactamasas, Método fenotípico, Bacilo Gram negativo, Carbapenemasas.

ABSTRACT

In order to assess the performance of five phenotypic methods for the detection of metallo- β -lactamase (MBL)-producing Gram-negative bacilli, an observational, descriptive and cross sectional study was implemented. 100 isolates of Gram-negative bacilli previously typed genotypically were included. The methods evaluated were: the combination disc test with inhibitor (EDTA), the double disc synergy test, the modified Hodge test (strain *E. coli* ATCC 25922), the modified Hodge test (strain *K. pneumoniae* ATCC 700603) and the Blue Carba Test. Of the 32 MBL-producing isolates, 27 were IMP, 3 VIM and 2 NDM. Of the 68 non-MBL producing isolates, 66 were non-MBL-carrying isolates, 1 CTX + impermeability and 1 KPC. The combination disc with inhibitor and the double disc synergy tests were the most specific (100%) and the Blue Carba Test was the most sensitive (100%). Regarding EDTA discs, the Kappa index was 1.0 among commercial discs and in-house discs, a perfect match. In conclusion, the five methods had a good performance for the detection of MBL-producing Gram-negative bacilli. The implementation of a phenotypic method for the detection of MBL-producing in routine clinical laboratories is strongly recommended. A cost-effective screening method should be chosen according to the characteristics of MBL producer prevalent.

Keywords: Metallo- β -lactamase, phenotypic method, Gram negative bacilli, carbapenemase.

INTRODUCCIÓN

La resistencia bacteriana constituye una amenaza cada vez mayor para la salud pública a nivel mundial. En los últimos años se ha observado la aparición y gran dispersión de los bacilos Gram negativos resistentes a los carbapenémicos, en los que el mecanismo implicado es la producción de betalactamasas capaces de hidrolizar este grupo de antimicrobianos (1-3).

Los antibióticos carbapenémicos son considerados la última línea de terapia efectiva disponible para el tratamiento de infecciones severas, la resistencia a estos antimicrobianos reduce las opciones de terapia clínica y conduce con frecuencia a la falla del tratamiento. Las carbapenemasas incluyen las serin-carbapenemasas o de clase A (tipo KPC), las metalobetalactamasas o de clase B (tipo VIM, IMP y NDM), y las oxacilinasas o de clase D (tipo OXA) (1, 4, 5).

Las metalobetalactamasas (MBL) se han propagado en muchos lugares geográficos a nivel mundial, incluyendo Perú. Se han identificado once tipos de enzimas MBL en diversos microorganismos, en su mayoría *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.* y *Enterobacteriaceae*. Una particular preocupación es que los genes de adquisición de MBL se encuentran localizados en integrones o insertados en elementos genéticos móviles como los plásmidos o transposones. Con el aumento de casos en todo el mundo y la tasa de diseminación de MBL, la temprana detección es crítica (6-19).

Actualmente, el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) recomienda el Test de Hodge Modificado (MHT), el Carba NP y métodos moleculares cuando exista sospecha de producción de carbapenemasas. Sin embargo, CLSI no cuenta con una guía para la detección confiable de

MBL. Un gran número de métodos fenotípicos para detección de MBL han sido desarrollados, la mayoría basados en la habilidad de los agentes quelantes, zinc y compuestos basados en thiol, de inhibir la actividad de las MBL (20-22).

En el Perú, desde la aparición del primer caso de carbapenemasa tipo KPC y la aparición de nuevos casos de MBL, por ejemplo del tipo NDM, es imprescindible que los laboratorios de microbiología clínica realicen cotidianamente la búsqueda de carbapenemasas. Para esta tarea se requiere de personal capacitado además de los recursos necesarios que garantice el desarrollo de los procedimientos microbiológicos y el análisis fiable de los resultados (23).

Objetivo general

Evaluar el desempeño de cinco métodos fenotípicos para la detección de metalobetalactamasas en bacilos Gram negativos tipificados genotípicamente.

Objetivos específicos.

- Determinar la sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la prueba de sinergia de doble disco (DDS).
- Determinar la sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la prueba de discos combinados con inhibidor.
- Determinar la sensibilidad, especificidad y valores predictivos del test de Hodge modificado (cepa *E.coli* ATCC 25922)
- Determinar la sensibilidad, especificidad y valores predictivos del test de Hodge modificado (cepa *K.pneumoniae* ATCC 700603)
- Determinar sensibilidad, especificidad y valores predictivos de Blue Carba Test (BCT)

CAPITULO I. MARCO TEÓRICO

1.1. Bacterias Gram negativas

En microbiología se define a las bacterias Gram negativas, según la tinción de Gram, como aquellas células de tinción rosácea debido a la safranina (tinción de contraste). Estas bacterias se caracterizan por tener una pared celular compleja, con una porción pequeña de peptidoglicano y membrana externa rica en lípidos (24).

Entre los bacilos Gram negativos de importancia clínica se encuentra los *Enterobacteriaceae*, bacterias de mayor frecuencia en muestras clínicas, implicados en casi cualquier tipo de enfermedad infecciosa. Las enterobacterias son bacilos gramnegativos, aerobios o anaerobios facultativos, no formadores de esporas, inmóviles o móviles por flagelos peritricos, oxidasa negativos, que producen ácidos por vía fermentativa a partir de la glucosa y reducen los nitratos a nitritos(24, 25).

Se han asociado a las bacterias de esta familia con una gran diversidad de infecciones clínicas que incluyen abscesos, neumonía, meningitis, septicemia e infecciones de las vías urinarias. Los microorganismos que están implicados con mayor frecuencia en las infecciones en el hombre son *E.coli* y varias especies incluidas en los géneros *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Serratia*, *Citrobacter* y *Providencia*(25).

Otro grupo de bacterias de importancia clínica son los bacilos Gram negativos no fermentadores, que se caracterizan por ser no esporulados y aerobios que no utilizan hidratos de carbono como fuente de energía o los degradan a través de vías metabólicas distintas de la fermentación. Las

especies más frecuentes son: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y *Stenotrophomonas manthophilii*.(24)

1.2 Mecanismos de Resistencia

Los mecanismos de resistencia bacteriana son complejos, variados y no se conocen por completo. Entre los principales mecanismos de resistencia de las bacterias tenemos:

Inactivación enzimática

Mecanismo bastante frecuente relacionado con la producción de diferentes tipos de enzimas. Ciertas bacterias producen enzimas que neutralizan la droga o sus efectos antimicrobianos, por ejemplo: betalactamasas(26).

Alteración de la permeabilidad de la membrana

La disminución de la permeabilidad concierne sobre todo a las bacterias Gram negativas, cuyas porinas se obturan parcial o totalmente o incluso desaparecen. La permeabilidad puede estar igualmente ralentizada por ciertas mutaciones que afectan a los LPS que, como consecuencia, disminuye la accesibilidad de los antibióticos a las porinas sobre el exterior de la membrana externa(26).

Eflujo activo de antibióticos

Propiedad de expulsar activamente los antibióticos para afuera de la célula, contribuyendo para una concentración inadecuada de la droga y, consecuentemente, acción no efectiva (bomba de eflujo)(26).

Alteración del sitio de ligación del antibiótico (diana)

Los antibióticos se ligan a sitios específicos en la bacteria. Si este sitio fuera alterado, el antibiótico no puede efectuar la ligación y se torna ineficiente contra la bacteria. Esta alteración es físico-química, disminuye la afinidad de la droga por el lugar y por lo tanto pérdida de la actividad antimicrobiana. En términos de resistencia adquirida, se puede observar una modificación parcial de la naturaleza de la diana, una modificación de número (hiperproducción), un cambio total (nueva diana) y a veces una asociación de varios de estos mecanismos(26).

1.3 Betalactamasas

Las betalactamasas según la definición del *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry*, son enzimas que catalizan la hidrólisis de amidos, amidinas y otros ligandos C-N, separando la base del sustrato. Cualquier antibiótico o grupo de antibióticos con betalactámicos puede ser inactivado por estas enzimas. La especificidad de una betalactamasa por un betalactámico es un determinante importante de la eficiencia con la cual la enzima hidroliza el antibiótico(1, 26).

Existe más de una clasificación de betalactamasas. Entre ellas se encuentra la clasificación de Ambler que las divide de acuerdo a su estructura molecular en 4 clases (A, B, C y D) y la de Bush, que las divide en 3 grupos funcionales (1, 2 y 3) de acuerdo a sus características de afinidad por el sustrato y la acción de los inhibidores (5, 24, 27, 28).

1.4 Carbapenemasas

Las carbapenemasas son betalactamasas capaces de hidrolizar carbapenémicos y están asociados a elementos genéticos transferibles. Estas enzimas se denominan genéricamente carbapenemasas y se

agrupan en las diferentes clases moleculares de Ambler que se corresponden con diferentes grupos funcionales de la clasificación de Bush y Jacoby del año 2010 (1, 5, 27). (Tabla 1)

Las serin carbapenemasas incluyen las enzimas SME, GES, IMI, NMC, KPC (clase A) y la enzima OXA (clase D). Respecto a las metalcarbapenemasas o MBL las enzimas VIM, IMP y NDM son las más importantes (1).

Tabla 1: Clasificación general de las carbapenemasas(1)

Clase molecular ¹ (Grupo funcional ²)	Enzimas	Inhibición por		ATM	Microorganismos	Localización genética
		CLA	EDTA			
A (2f)	Sme, IMI, NmcA	±	-	R	<i>Serratia marcescens</i> <i>Enterobacter cloacae</i>	Crom
	KPC	+	-	R	Enterobacterias	PI
	GES	+	-	R	Enterobacterias <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PI
B (3)	L1 CcrA Cpha BcII	-	+	S/R ³	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Bacteroides. fragilis</i> <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Bacillus cereus</i>	Crom
	IMP, SPM, SIM, GIM, VIM, AIM, DIM, KHM, NDM	-	+	S	Enterobacterias <i>Pseudomonas</i> spp. BGNNF	PI (Crom) ⁴
D (2df)	OXA (OXA-48)	±	-	S	<i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Enterobacterias	Crom, PI

¹Según la clasificación de Ambler, ²según la clasificación de Bush y Jacoby, 2010; ³puede aparecer resistente por la coexistencia con otros mecanismos de resistencia, ⁴ocasionalmente de codificación cromosómica. CLA, ácido clavulánico; ATM, aztreonam; BGNNF, bacilos gramnegativos no fermentadores; PI, plasmídica; Crom, cromosómica

1.5 Metalobetalactamasas

Las Metalobetalactamasas (MBL) pertenecen al grupo B de Ambler y 3 de Bush y Jacoby. Sus características principales son: poseen actividad contra los carbapenémicos, no hidrolizan los monobáctamicos como el aztreonam, son inhibidas por quelantes como el EDTA o el Mercapto acetato de Sodio, requieren cationes divalentes (generalmente Zn⁺² como cofactor para su

actividad catalítica) y no son inhibidas por los antibióticos suicidas (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam) que bloquean la acción de las serino- β -lactamasas (29, 30).

Las MBL son producidas constitutivamente por algunas especies bacterianas como *Bacillus cereus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Aeromonas sp.* y *Elizabethkingia meningoseptica* y se ha conocido a partir de la década de los 90' nuevos genes que codifican MBL, conocidos como MBL móviles o adquiridos, que ya han sido descritos mundialmente en bacterias de importancia clínica como *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* y algunas enterobacterias, pero estos están localizados o asociadas generalmente a estructuras genéticas móviles (6, 7, 30).

Los genes dominantes de MBL son aquellos que codifican para las enzimas adquiridas IMP (Japón) y VIM (Italia), cada uno con variantes alélicas. Luego han sido descritos los genes codificantes de enzimas SPM (Brasil), GIM (Alemania), SIM (Corea), AIM (Australia), KHM (Japón), NDM (India), DIM (Holanda), TMB (Libia) y FIM (Italia), estas menos diseminadas por el mundo (6-18). En el Perú se están estudiando la presencia de estas enzimas, sin embargo, solo se han caracterizado algunos aislamientos, encontrándose la presencia de enzimas tipo IMP, VIM (19, 31, 32) y recientemente enzimas del tipo NDM (datos por publicar).

1.6 Detección fenotípica de metalobetalactamasas.

Para la detección fenotípica de las carbapenemasas se debe tener en cuenta que no hidrolizan el aztreonam (y por tanto aparecen sensibles en el antibiograma), además, catalizan la ruptura del anillo betalactámico usando cationes divalentes (Zn^{2+}) por lo que su actividad se inhibe en presencia de agentes quelantes de iones, como el EDTA. Algunos aislamientos presentan conjuntamente otros mecanismos de resistencia, como por

ejemplo una betalactamasa de espectro extendido (BLEE) donde el aztreonam aparecerá resistente (1, 33).

En la actualidad no existe un método fenotípico estandarizado, sin embargo, se han diseñado diversidad de técnicas para identificar fenotípicamente estas enzimas (1, 33). Entre los métodos desarrollados tenemos: prueba de Sinergia de doble disco (DDS), prueba de discos combinados con inhibidor, el Test de Hodge modificado (MHT), el Blue Carba Test (BCT), etc.

Prueba de Sinergia de doble disco (DDS)

El desarrollo de una prueba simple y barata para el screening de aislamientos productores de MBL (tipo IMP-1), como la prueba de sinergia de doble disco, fue desarrollada y descrita por primera vez por Arakawa y colaboradores en el año 2000, quienes recomendaron el uso de discos de CAZ y discos de ácido 2-mercaptopropiónico para el desarrollo de la prueba (22). Posteriormente, Lee y colaboradores (2001) usaron discos de IPM y de EDTA para desarrollar esta prueba, posteriormente en el año 2003 evaluó el desempeño usando un disco de EDTA (750ug)-más-SMA (2mg) , concluyendo este último como el de mejor rendimiento (34, 35).

Para la prueba, un cultivo fresco de la cepa problema es suspendido (0.5 McFarland) e inoculado en un agar Mueller-Hinton. Luego, se coloca un disco de IPM (puede ser MEM o CAZ) y uno de EDTA a una distancia centro-centro de 1.0-2.0cm (la separación óptima puede variar en función de la cepa). Después de una incubación a 35°C durante la noche (16-20 horas), la presencia de una ampliación del halo de inhibición del carbapenémico en la zona cercana al EDTA (sinergia) o de una “zona fantasma” (inhibición del crecimiento) entre el carbapenémico y el EDTA se interpreta como positivo (1, 36).

Prueba de discos combinados con inhibidor

En el año 2002, Yong y colaboradores determinaron la factibilidad de usar discos de imipenem (IPM) con EDTA para confirmar aislamientos de *Pseudomonas spp* y *Acinetobacter spp* productores de MBL. Ellos pudieron concluir que la prueba, usando IPM + EDTA (750ug), era simple de realizar y que poseía una alta sensibilidad en diferenciación de aislamientos productores de MBL (37). Con el pasar de los años se han realizado varios estudios de comparación de métodos, así por ejemplo, en el año 2008, Behere y colaboradores realizan un estudio de comparación de cuatro técnicas fenotípicas de detección de MBL y concluyeron en que esta prueba era superior a la prueba de sinergia de doble disco y tenía una sensibilidad equivalente a la prueba de E-test (38).

Esta técnica es muy fácil, económica y puede ser incorporado dentro de las pruebas de rutina de cualquier laboratorio de Microbiología(38, 39). La mayor ventaja de la prueba de discos combinados es la existencia de un punto de corte claro como criterio(40). Para su desarrollo es necesario realizar el procedimiento estándar de un antibiograma, inoculando una placa de agar Mueller-Hinton a partir de una suspensión de la cepa problema (0.5 escala McFarland), luego se coloca discos de meropenem (MEM) y meropenem-EDTA (en caso de MBL). También puede utilizarse discos con IPM y IPM-EDTA. Finalmente se lleva a incubación a 35°C durante 16-20 horas. Se considera un resultado positivo a una diferencia en los halos mayor o igual a 5mm (1).

Test de Hodge modificado (MHT) – cepa *E.coli* ATCC 25922

El desarrollo del Test de Hodge modificado fue descrito en el año 2000 por Lee y colaboradores. Se le llamada MHT ya que se realizaron dos modificaciones importantes: la cepa indicadora pasó de ser el

Staphylococcus aureus ATCC 25923 a la *Escherichia coli* ATCC 25922 y el disco de penicilina 10U por un disco de imipenem 10ug (34).

El MHT ha sido ampliamente utilizado para el screening de carbapenemasas debido a que analiza directamente la actividad de la muestra analizada. El CLSI recomienda su uso para enterobacterias en casos de MICs elevados de carbapenémicos y/o halos de inhibición reducidos, pero no incluye *Pseudomonas aeruginosa* (21, 41).

Para la realización del Test de Hodge, es necesario seguir el procedimiento estándar para la realización de un antibiograma por el método de difusión con discos. Se inocula una placa de agar Mueller-Hinton a partir de una suspensión de la cepa *E. coli* ATCC 25922 en solución salina con una turbidez equivalente a un 0,5 de la escala de McFarland diluida al 1:10. Luego se coloca un disco con un carbapenémico (imipenem, meropenem o ertapenem) en el centro de la placa. Posteriormente, se inocula 3-5 colonias de la cepa problema formando una estría radial desde 2-3 mm del disco con carbapenémico hacia el borde de la placa. Se deja incubar a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 16-20 horas. Se considera un MHT positivo cuando hay presencia de una zona de inhibición distorsionada a los lados de la estría debido al crecimiento de la cepa indicadora (1, 21, 34, 41).

Test de Hodge modificado (MHT) – cepa *K.pneumoniae* ATCC 25922

Pasteran y colaboradores, en el año 2011, publican un artículo donde presentan una nueva modificación del Test de Hodge. Ellos usan un nuevo indicador, *K.pneumoniae* ATCC 700603, el cual sustituye a la *E.coli* ATCC 25922. Su estudio demostró la capacidad de esta nueva modificación de detectar cepas productoras de carbapenemasas (100% sensibilidad y 98% especificidad), incluyendo muestras de *P.aeruginosa* (41).

Para la realización del Test de Hodge modificado, es necesario seguir el procedimiento estándar (ver Test de Hodge modificado – cepa *E.coli* ATCC 25922), con la variación en la cepa indicadora. Se reemplaza la cepa *E.coli* ATCC 25922 por la cepa *K.pneumoniae* ATCC 700603(1, 21, 34, 41).

Blue Carba Test (BCT)

El BCT es una prueba bioquímica rápida (menos 2 horas) para la detección de bacilos Gram negativos productores de carbapenemasas directamente del cultivo bacteriano. Se basa en la hidrólisis in vitro del IPM por las colonias bacterianas, el cual resulta en un cambio de pH detectado por el indicador de azul de bromotimol(42-44).

En el año 2013, Pires y colaboradores dieron a conocer esta nueva prueba de detección. Ellos reportaron una sensibilidad y especificidad de 100% para la detección de carbapenemasas en cultivos bacterianos de *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, y *Acinetobacter sp.*(42). Posteriormente, en el año 2015, Pasteran y colaboradores presenta un estudio de comparación entre BCT in-house y el Rapid CARB Blue Kit (Rosco Diagnostica A/S, Denmark) donde encuentra que ambos presentaban un rendimiento equivalente en la detección de cepas productoras de carbapenemasas(45).

CAPITULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Diseño de investigación

El presente es un estudio observacional, descriptivo y de corte transversal.

3.2 Población

La población del presente estudio está conformada por aislamientos de bacilos Gram negativos tipificados genotípicamente.

3.3 Muestra

El muestreo se realizó por conveniencia, se incluyeron 100 aislamientos de bacilos Gram negativos tipificados genotípicamente: 32 productores de MBL y 68 no productores de MBL. (Tabla 1)

3.4 Procedimientos

Se recolectaron un total de 100 aislamientos de bacilos Gram Negativos tipificados genotípicamente en estudios preliminares. La selección de la muestra a utilizar se realizó con la finalidad de tener una máxima cobertura de genes de resistencia tipo MBL presentes en nuestro país Perú. Los datos de cada aislamiento clínico fueron almacenados en una hoja de recolección de datos. La información solicitada fue aislamiento identificado, referencia del estudio y perfil de resistencia (tipificación genotípica) (Anexo A).

Para el procesamiento de la muestras, los aislamientos fueron recuperados en Agar Mac Conkey e incubados a 35°C por 18-20 horas. Todos los procedimientos se realizaron en el servicio de microbiología clínica del Instituto Nacional de Salud del Niño.

Prueba de Sinergia de doble disco (DDS)

En el presente estudio se realizó la prueba usando discos de EDTA comercial (EDTA, Bioanalyse, Turkía y monodiscos de EDTA, Britania, Argentina) y discos EDTA elaborados in-house, para este último se añadió 10ul de EDTA 0.1M a discos de sensibilidad en blanco. Para cada muestra, se realizó el procedimiento estándar de un antibiograma, en una placa de Agar Mueller-Hinton se inoculó una suspensión de la muestra (0.5 escala de McFarland), en ella se colocó un disco de EDTA en el centro de la placa, un disco de IPM, MEM y CAZ a 1.5 cm del disco de EDTA (centro a centro). Finalmente, se llevó a incubar a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 16-20 horas.

Figura N°1

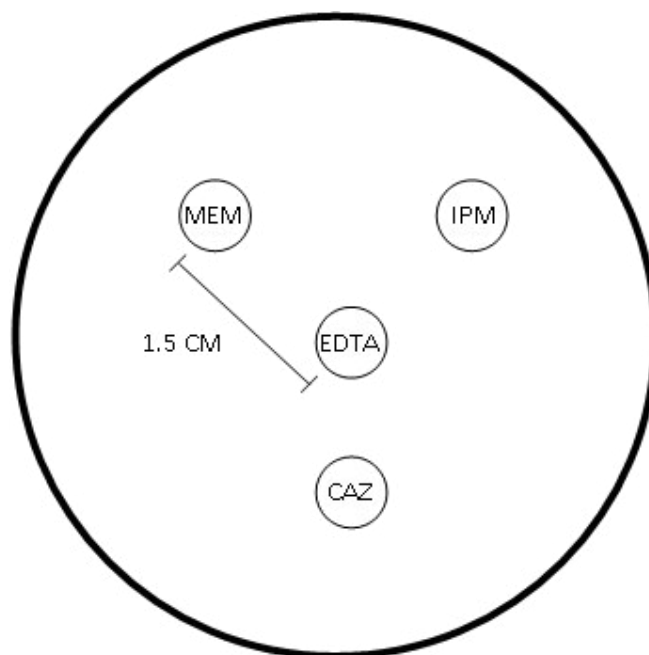


Figura N°1. Representación esquemática de la colocación de los discos para la prueba de Sinergia de doble disco. IPM: Imipenem; MEM: Meropenem; CAZ: Ceftazidima; EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

Al finalizar la incubación se examinó visualmente la apariencia de las zonas de inhibición. Los resultados se interpretaron como positivos si se observaba una ampliación del halo de inhibición del carbapenémico en la zona cercana al disco de inhibidor (sinergia) o presencia de una “zona fantasma” (inhibición del crecimiento) entre el carbapenémico y el inhibidor.

Prueba de Discos combinados con inhibidor (EDTA)

Para la prueba de discos combinados se prepararon discos de IPM y MEM con EDTA, agregando a cada disco 10ul de EDTA 0.1M. Luego, se realizó el procedimiento estándar de un antibiograma, en una placa de Agar Mueller-Hinton se inoculó una suspensión de la muestra (0.5 escala de McFarland), en ella se colocó un disco de IPM, MEM y los discos de IMP-EDTA y MEM-EDTA preparados in-house. Finalmente, se llevó a incubar a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 16-20 horas. Se repitió el procedimiento por cada muestra.

Figura N°2

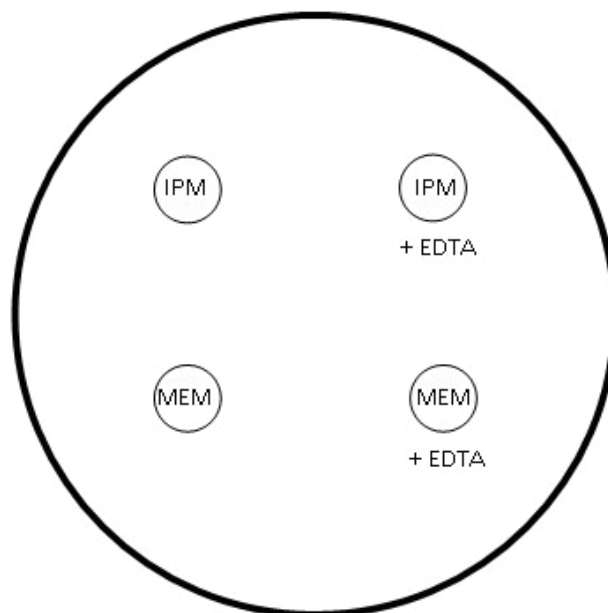


Figura N°2. Representación esquemática de la colocación de los discos para la prueba de Discos combinado con inhibidor (EDTA). IPM: Imipenem; MEM: Meropenem; EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

Para la interpretación de los resultados fue necesario medir en milímetros los diámetros de la zona de inhibición completa (incluyendo el diámetro del disco). Un incremento mayor o igual a 5mm del diámetro de inhibición del carbapenémico con inhibidor respecto al del carbapenémico se interpretó como positivo.

Test de Hodge Modificado (MHT)

El siguiente método se desarrolló usando dos cepas indicadoras diferentes: cepa *E.coli* ATCC 25922 y la cepa *K.pneumoniae* ATCC 700603. Para ello se resembró en agar trypticasa de soya (TSA) y se incubó a 35°C por 16-20 horas cada una de las cepas indicadoras un día previo al procedimiento. Se realizó una suspensión de la cepa indicadora con una turbidez equivalente a un 0.5 de la escala de McFarland y se diluyó al 1:10. Luego, se inoculó en una placa de Mueller-Hinton a partir de la suspensión 0.5 McFarland y en otra a partir de la dilución 1:10. En cada uno de ellas se colocó un disco de IPM o MEM en el centro de las placas y se realizó un estría de 2-3cm de la muestra (3-5 colonias). Finalmente, se llevó a incubar 35°C±2°C por 16-20 horas.

Los resultados se interpretaron de la siguiente manera: positivo, si había presencia de una zona de inhibición distorsionada a los lados de la estría debido al crecimiento de la cepa indicadora de lo contrario, negativo.

Figura N°3

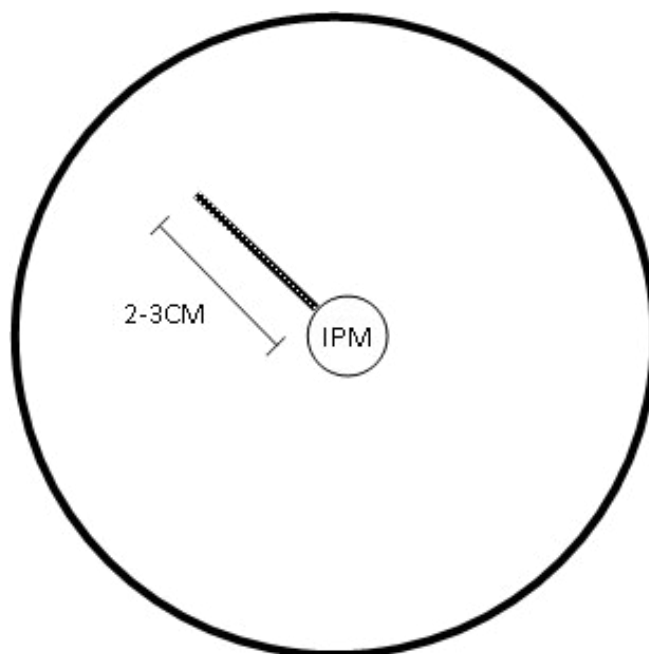


Figura N°3. Representación esquemática de la colocación de los discos para el Test de Hodge Modificado. IPM: Imipenem

Blue Carba Test

Para el BCT, en primer lugar, se preparó una solución A (por duplicado) disolviendo 2.87mg de SO_4Zn heptahidratado en 100ml de Azul de bromotimol. Con ayuda de un potenciómetro se ajustó esta solución a pH 7.0 y se filtró. Luego, se añadió 300mg de imipenem a 100ml de la solución A (concentración final 3mg/ml). Para el ensayo fue necesario utilizar 2 crioviales por muestra, en cada uno de ellos se agregó 100ul de la Solución A y 100ul de la solución A + IPM; a cada criovial se añadió una asada de 5ul de la muestra y se llevó a incubar a 35-37°C por un máximo de 2 horas en agitación (cada 15 min).

Para la interpretación de los resultados fue necesaria la observación de los dos crioviales por muestra. Si el color del criovial sin imipenem era de color azul y el del criovial con imipenem amarillo o verde, se interpretaba como positivo, de la misma forma si el control (criovial sin imipenem) era de color verde y el criovial con imipenem amarillo. Un resultado fue interpretado como negativo si ambos crioviales era de color azul o de color verde.

3.7 Análisis de los datos

Una vez obtenidos los resultados de los métodos, estos se almacenaron en una base de datos en Microsoft Excel. Posteriormente, se realizó el análisis descriptivo y estadístico, es decir, los cálculos de sensibilidad, especificidad, valores predictivos y el coeficiente Kappa de Cohen.

3.8 Consideraciones éticas

Todos los procedimientos del presente estudio se realizaron en aislamientos bacterianos. Los datos demográficos de los pacientes de donde proceden las cepas bacterianas que fueron aisladas en algún momento (anterior al estudio) no son mencionados en el trabajo, manteniendo siempre la confidencialidad en acuerdo con los investigadores que han permitido que se trabaje con las cepas bacterianas, de acuerdo con los lineamientos de las buenas prácticas clínicas y de ética en investigación biomédica. Se garantiza la confidencialidad de los datos obtenidos.

CAPITULO III. RESULTADOS

Aislamientos bacterianos

Un total de 100 aislamientos de bacterias Gram Negativas tipificadas molecularmente fueron incluidos en el estudio (Tabla 1.). De los 32 aislamientos productoras de MBL, 27 fueron del tipo IMP, 3 del tipo VIM y 2 del tipo NDM. De los 68 aislamientos no productores de MBL, 66 fueron aislamientos no poseedores de MBL, 1 del tipo CTX + impermeabilidad y 1 aislamiento del tipo KPC.

Tabla 1.
Muestras , especies bacterianas y referencias

Aislamientos (n=100)	No. De aislamientos	Fuente o referencia	Metodología	Gen
Productores de MBL (n=32)				
<i>P.aeruginosa</i>				
IMP	5	E.Gonzales 2013	Multiplex PCR	gen <i>bla</i> IMP
	22	E.Gonzales 2013	Multiplex PCR	gen <i>bla</i> IMP
VIM	2	E.Gonzales 2013	Multiplex PCR	gen <i>bla</i> VIM
<i>Klebsiella pneumoniae</i>				
VIM	1	PEEC - 2013	Información no brindada	
<i>Providencia sp.</i>				
NDM	1	INEI-ANLIS*	PCR	gen <i>bla</i> NDM
<i>P.mirabilis</i>				
NDM	1	INEI-ANLIS*	PCR	gen <i>bla</i> NDM
No productores de MBL (n=68)				
<i>P.aeruginosa</i>	66	E.Gonzales 2013	Multiplex PCR	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>				
CTX + Impermeabilidad	1	PEEC - 2015	Información no brindada	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>				
KPC	1	PEED - 2015	Información no brindada	

MBL, metalobetalactamasas. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI) - ANLIS "DR. CARLOS G. MALBRAN". PEEC, Programa de Evaluación Externa de la calidad . PEED, Programa de Desempeño de la calidad

*Aislamientos confirmados por INEI-ANLIS

Prueba de sinergia de doble disco (DDS)

La prueba de sinergia de doble disco usando disco de EDTA identificó 31 (31/32) aislamientos productores de MBL (96.9% Sensibilidad). El índice Kappa resultó de 0.98, muy buena/casi perfecto. La concordancia entre la prueba usando EDTA comercial y EDTA in-house resultó perfecta (1.0 Índice Kappa).

Figura N° 4

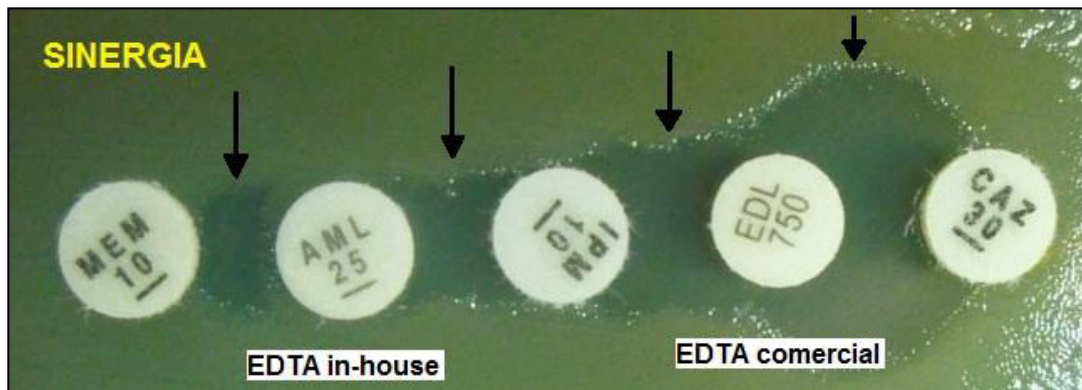


Figura N°4. Prueba de Sinergia de doble disco para la detección de MBL. Se observa una ampliación del halo de inhibición del carbapenémico en la zona cercana al disco de inhibidor (sinergia) lo que se interpreta como un resultado positivo para MBL (como indica la flecha).

Prueba de Discos combinados con inhibidor (EDTA)

La prueba de discos combinados con inhibidor detectó 28 (28/32) aislamientos productores MBL (87.5% Sensibilidad) .El índice Kappa resultó de 0.90, muy buena/casi perfecto.

Figura N° 5

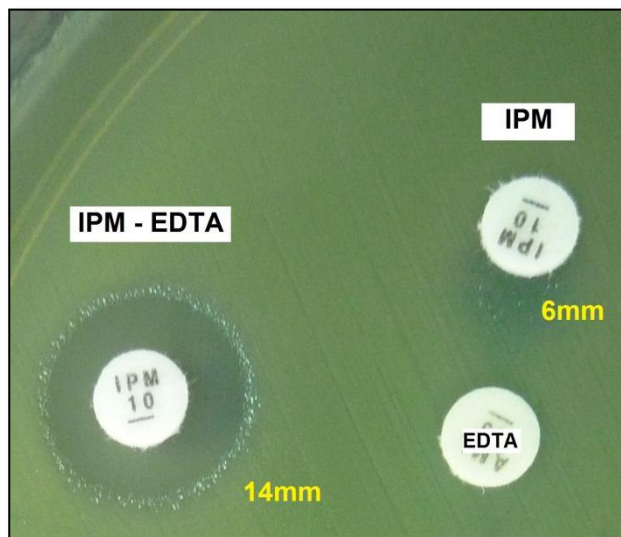


Figura N°5. Prueba de Discos combinados con inhibidor (EDTA) para la detección de MBL. Se observa que la diferencia del halo de inhibición entre el disco de IPM (6mm) y el de IPM-EDTA (14mm) es de 8mm. Una diferencia mayor de 5mm nos indica positivo para MBL.

Test de Hodge modificado – *E.coli* ATCC 25922

Con el Test de Hodge modificado usando como cepa indicadora *Escherichia coli* ATCC 25922 se obtuvo 29 aislamientos positivos, de los cuales 28 resultaron verdaderos positivos (28/29) y 1 falso positivo (1/29). El test mostró una sensibilidad de 87.5%, una especificidad de 98.5% y un índice Kappa de 0.88, muy buena/casi perfecto.

Figura N° 6

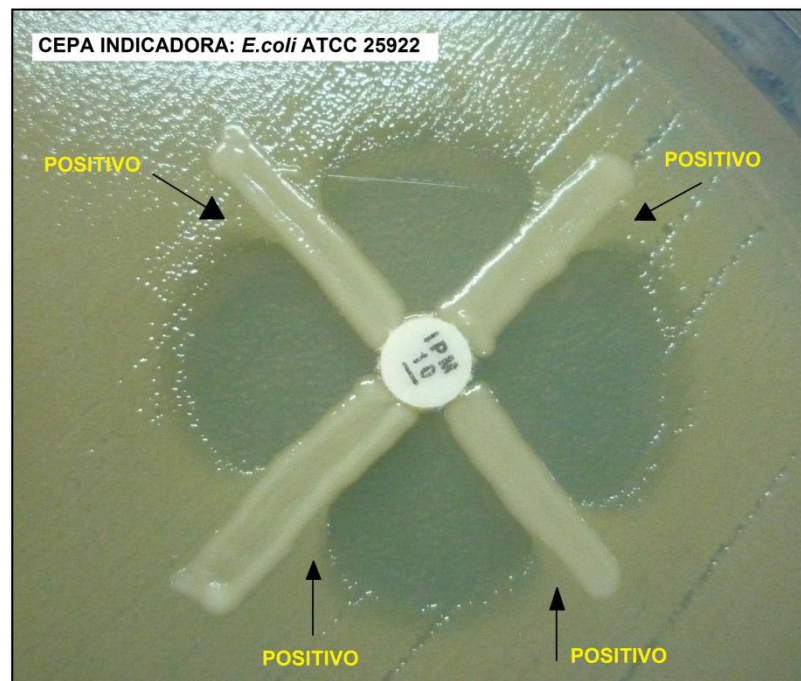


Figura N°6. Test de Hodge modificado usando como cepa indicadora *E.coli* ATCC 25922 para la detección de carbapenemasas. Se puede observar la presencia de una zona de inhibición distorsionada a los lados de la estría debido al crecimiento de la cepa indicadora, lo que se interpreta como un resultado positivo para carbapenemasas (como indica la flecha).

Test de Hodge modificado – *K.pneumoniae* ATCC 700603

Con el test de Hodge modificado usando como cepa indicadora *K.pneumoniae* ATCC 700603 se identificó 28 aislamientos positivos, de los cuales 27 resultaron verdaderos positivos (27/28) y 1 falso positivo (1/28). El test mostró una sensibilidad de 84.4%, una especificidad de 98.5% y un índice Kappa de 0.86, muy buena/casi perfecto.

Figura N° 7

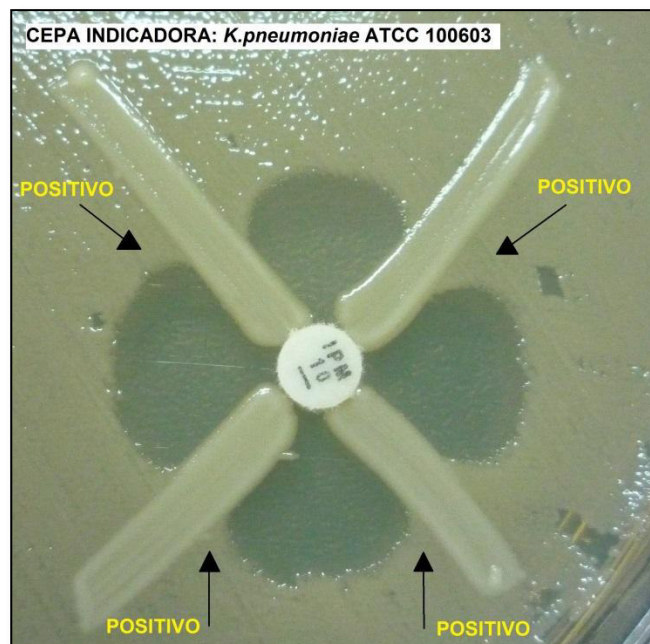


Figura N°7. Test de Hodge modificado usando como cepa indicadora *K.pneumoniae* ATCC 700603 para la detección de carbapenemasas. Se puede observar la presencia de una zona de inhibición distorsionada a los lados de la estría debido al crecimiento de la cepa indicadora, lo que se interpreta como un resultado positivo para carbapenemasas (como indica la flecha).

Blue Carba Test (BCT)

El Blue Carba Test detectó 33 aislamientos positivos, de los cuales 32 fueron verdaderos positivos (32/33) y 1 resultó falso positivo (1/33). La sensibilidad del test fue de 100%, la especificidad de 98.5% y el índice kappa de 0.98, muy buena/casi perfecto.

Figura N° 8

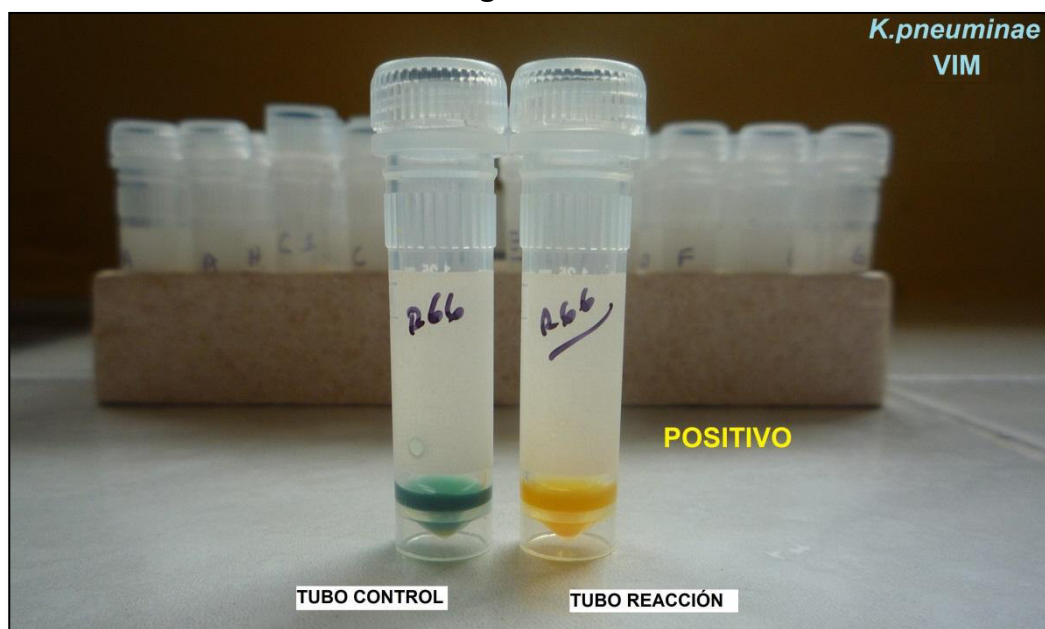


Figura N°7. Blue Carba Test para la detección de cepas productoras de carbapenemasas. Se observa de color amarillo el criovial con imipenem (tubo reacción) y de color azul el criovial sin imipenem (tubo control), lo que se interpreta como carbapenemasa positivo.

Tabla 2.

Resumen de los datos estadísticos de los cinco métodos fenotípicos con referencia a la tipificación genotípica.

Métodos	VP	FN	S (IC95%)	VN	FP	E (IC95%)	VPP (IC95%)	VPN (IC95%)	Índice Kappa
Sinergia de doble disco (DDS)	31	1	96.9 (84.3-99.4)	68	0	100 (94.7-100)	100 (94.7-100)	98.6 (92.2-99.7)	0.98
Discos combinados con inhibidor (EDTA)	28	4	87.5 (71.9-95.0)	68	0	100 (94.7-100)	100 (87.9-97.8)	94.4 (86.6-97.8)	0.90
Test de Hodge – <i>E.coli</i> ATCC 25922	28	4	87.5 (71.9-95.0)	67	1	98.5 (92.1-99.7)	96.6 (82.8-99.4)	94.4 (86.4-97.8)	0.88
Test de Hodge - <i>K.pneumoniae</i> ATCC 700603	27	5	84.4 (68.2-93.1)	67	1	98.5 (92.1-99.7)	96.4 (82.3-99.4)	93.1 (84.8-97.0)	0.86
Blue Carba Test	32	0	100 (89.3-100)	67	1	98.5 (92.1-99.7)	97.0 (84.7-99.5)	100 (94.6-100)	0.98

VP: verdaderos positivos; FN: falsos negativos; S: sensibilidad; VN: verdaderos negativos; FP: falsos positivos; E: especificidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo

Gráfico N° 1

**Sensibilidad y Especificidad de los cinco métodos fenotípico de
detección de MBL**

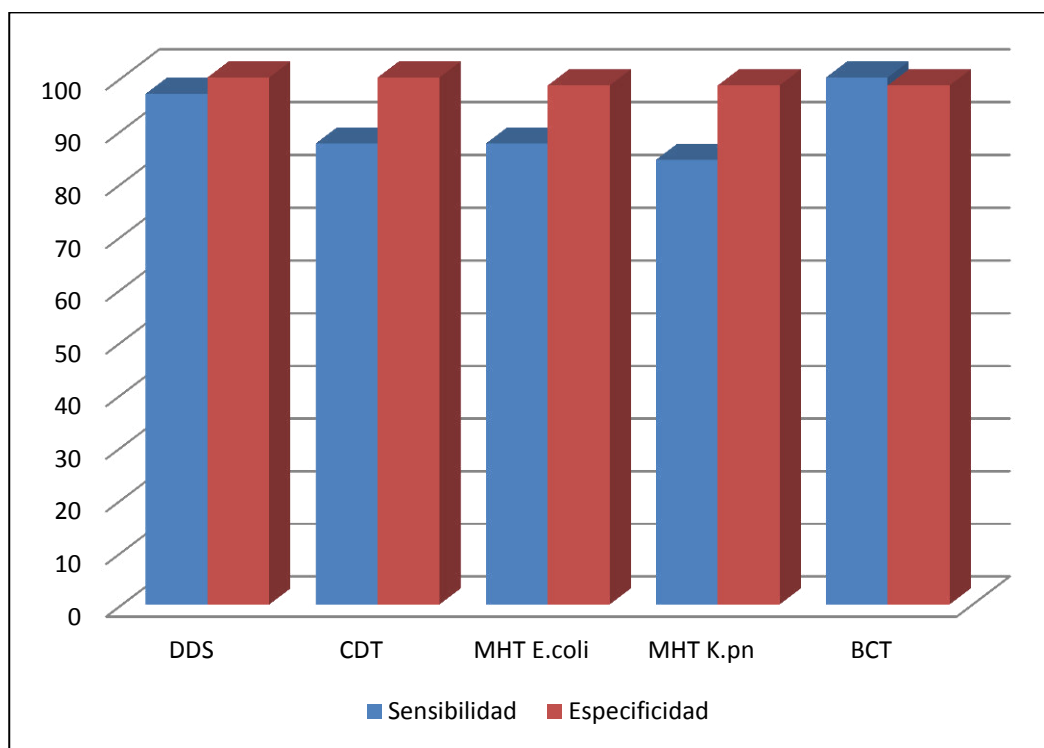


Gráfico N°1.

DDS: Sinergia de doble disco; CDT: Discos combinados con inhibidor; MHT *E.coli*: Test de Hodge Modificado – *E.coli* ATCC 25922; MHT K.pn: Test de Hodge Modificado – *K.pneumoniae* ATCC 700603; BCT: Blue Carba Test.

Tabla 3.

Comparación de los cinco métodos fenotípicos con referencia a la tipificación genotípica.

TG	N.	Sinergia de doble disco (DDS)		Discos combinados con inhibidor		MHT <i>E.coli</i> ATCC 25922		MHT <i>K.pneumoniae</i> ATCC 700603		Blue Carba Test	
		ID	ND	ID	ND	ID	ND	ID	ND	ID	ND
IMP	27	26	1	23	4	23	4	22	5	27	0
VIM	3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0
NDM	2	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0
TOTAL	32	31/32		28/32		28/32		27/32		32/32	

TG: tipificación genotípica; N.: número de aislamientos; ID: identificados; ND: no identificados; MHT: test de Hodge Modificado

CAPITULO IV. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los bacilos Gram negativos productores de MBL están siendo reportados en muchas regiones alrededor del mundo (6-18). Diversos estudios se han desarrollado en la búsqueda del método fenotípico más sensible, específico y de rápida detección de MBL. En la presente investigación hemos evaluado el desempeño de cinco métodos fenotípicos para la detección de MBL: Sinergia de doble disco, Discos combinados con inhibidor (EDTA), Test de Hodge modificado con cepa *E. coli* ATCC 25922, Test de Hodge modificado con cepa *K. pneumoniae* ATCC 700603 y Blue Carba Test.

Para el estudio se recolectaron 100 aislamientos de bacilos Gram Negativos productores de MBL. De los 32 aislamientos productores de MBL 27 (84.3%) fueron del tipo IMP, el cual, según estudios realizados por Edgar Gonzales y colaboradores, es el gen de mayor prevalencia en nuestro medio seguido del tipo VIM (3/32, 9.4%) (19). Las MBL del tipo NDM (2/32, 6.25%) fueron halladas recientemente en el año 2014 y 2015 (datos por publicar). Adicionalmente se incluyeron 68 aislamiento no productores de MBL (negativos para los genes IPM y VIM), entre los cuales se incluyó un aislamiento confirmado CTX + impermeabilidad y otro aislamiento confirmado KPC.

El primer método estudiado fue Sinergia de doble disco (DDS). El método se realizó utilizando discos de CAZ (30ug), IPM (10ug) y MEM (10ug) (22, 34). Como inhibidor se utilizó EDTA, los discos de EDTA comerciales (Bioanalyse) contenían 750ug EDTA, los discos preparados in-house contenían 10ul de EDTA 0.1M (292ug) y adicionalmente se utilizaron discos de EDTA+SMA (Britania). Al analizar los resultados se pudo observar una alta sensibilidad y especificidad de la prueba, 96.9% y 100% respectivamente. Los resultados son similares a los obtenidos en el año

2001 por Lee y colaboradores (Korea), quienes obtuvieron una sensibilidad y especificidad de 100% evaluando aislamientos MBL positivos tipo VIM (gen *bla_{VIM-2}*)(34). En el año 2006, Care Franklin y colaboradores (Australia) evaluaron aislamientos poseedores de genes IMP-1, IMP-4, VIM-2 y VIM-4, obteniendo una sensibilidad de 79% y especificidad de 98% para DDS(46). Dos años más tarde en Grecia, Irene Galani y colaboradores obtienen una sensibilidad y especificidad de 100% y 91.9% respectivamente para DDS usando una distancia de 10mm entre los discos de IPM y EDTA, los aislamientos fueron del tipo VIM-1(47).

En el DDS, el uso de discos de CAZ ayuda en la interpretación de los resultados, sin embargo, no es recomendable debido a su baja especificidad para la detección de MBL(34). Respecto a los discos de EDTA se encontró un índice Kappa de 1.0 entre los discos comerciales y los discos in-house, es decir una concordancia perfecta. Sin embargo, se han encontrado observaciones respecto a la marca Bionalyse, ya que presentó un halo de inhibición propio, suceso que no se observó en el uso de discos de EDTA más SMA de la marca Britania y tampoco en los discos elaborados in-house con EDTA 0.1M (292ug). La presencia del halo puede deberse a la concentración de EDTA (750ug); la menor concentración, como en el caso de EDTA 0.1M (292ug), permite disminuir los efectos inhibitorios con el EDTA solo; por otro lado la adición de 2mg SMA también permite disminuir este efecto(35, 46). No se recomienda trabajar con ácido 2-mercaptopropiónico(2MPA) ya que es un compuesto volátil y oloroso(40). La distancia entre los discos inicialmente fue de 15mm centro-centro, sin embargo, se encontró que una distancia de 10 mm permite una mejor visualización de la sinergia.

El segundo método evaluado fue Discos combinados con inhibidor (EDTA). Para el desarrollo del método se usaron discos de EDTA-IPM y EDTA-MEM

elaborados in-house, la concentración añadida de EDTA fue de 10ul 0.1M. La prueba mostró una sensibilidad de 87.5% y una especificidad de 100%. La presentación del método se realizó en el año 2002, donde Yong y colaboradores (Korea) obtuvieron una sensibilidad y especificidad de 100% para la prueba. Sin embargo, su evaluación fue solo en aislamiento de *Pseudomonas sp.* y considerando un incremento $\geq 7\text{mm}$ como positivo(37). En el año 2008, Irene Galani y colaboradores (Grecia) evalúa el método usando el mismo criterio de $\geq 7\text{mm}$, obteniendo una sensibilidad de 94.7% y una especificidad de 98.0%(47). Recientemente, en Brazil (2014), Andréa Lucena y colaboradores publican sus resultados donde obtuvieron una sensibilidad de 100% y una especificidad de 88%, sin embargo, estos últimos fueron hallando en aislamientos de *Pseudomonas aeruginosas* y usando un punto de corte $\geq 8\text{mm}$.

Para el desarrollo del método de discos combinados con inhibidor se prefirió el uso de EDTA como inhibidor ya que diversos estudios lo mencionan como más sensible y específico para detectar productores de MBL y no se consideró el uso de 2MPA ya que es un químico volátil(36, 37). Se utilizó el criterio, según lo recomendado por la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, de un incremento mayor o igual a 5mm del diámetro de inhibición para considerar un resultado positivo(1). El criterio de $\geq 5\text{mm}$ permitió diferenciar 28/32 muestras positivas de forma clara y objetiva.

El tercer método desarrollado es la primera modificación del Test de Hodge presentado en el año 1978 por Hodge y colaboradores(48). El test de Hodge modificado usando como cepa indicadora *E. coli* ATCC 25922 mostró una sensibilidad de 87.5% y una especificidad de 98.5%. En el año 2001, Lee y colaboradores (Korea) obtuvieron una sensibilidad de 100% y una especificidad de 88%. Años más tarde en el 2013, Tatsuya Hattori y

colaboradores (Japón) hallan un sensibilidad y especificidad de 70.8% y 100% respectivamente, quien además indican que la prueba presenta falsos positivos con cepas portadoras de BLEE y muestra resultados negativos o débil positivos para aislamientos tipo NDM. Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran lo contrario a lo mencionado por Tatsuya y colaboradores ya que las muestras tipo NDM resultaron positivas para el método (Tabla 3.). Se detectó un resultado falso positivo, obtenido de una muestra *Klebsiella pneumoniae* KPC, esto debido a que el método de Hodge modificado es de utilidad para la detección de carbapenemasas, como KPC, mas no específicamente de MBL. Adicionalmente, se desarrolló el método usando una suspensión de la muestra al 0.5 McFarland y una dilución al 1/10 de esta. Se encontró que al usarse directamente la suspensión de 0.5 McFarland la lectura resultaba difícil de interpretar por lo que se prefirió trabajar con una dilución 1/10 de ésta.

El test de Hodge modificado usando como cepa indicadora *K. pneumoniae* ATCC 700603 fue el cuarto método evaluado. Similar a lo obtenido con el test de Hodge – cepa *E.coli* ATCC 25922 la sensibilidad y especificidad del método fue de 84.4% y 98.5% respectivamente. En año 2011 Pasteran y colaboradores presentan el Test de Hodge modificado usando como cepa indicadora *K. pneumoniae* ATCC 700603, ellos obtuvieron una sensibilidad de 100% y una especificidad de 97%(41). El resultado falso positivo, al igual que en el tercer método, fue debido a la muestra *Klebsiella pneumoniae* tipo KPC. El método se desarrolló usando una dilución al 1/10 de una suspensión de la muestra al 0.5 McFarland. El test de Hodge modificado es ampliamente usado como una prueba de screening de carbapenemasas en laboratorios de rutina debido a que directamente analiza la actividad de la carbapenemasa de una muestra problema(34). EL CLSI recomienda su uso en *Enterobacteriaceae* con MICs elevados para carbapenemes o zonas de inhibición reducidas(21). Sin embargo, esta recomendación no incluye

Pseudomonas aeruginosas, por lo que el Test de Hodge modificado usando como cepa indicadora *K. pneumoniae* ATCC 700603, resultado ser una buena alternativa(41).

El último método evaluado es el Blue-Carba test donde se utiliza el indicador azul de bromotimol, una variante del test Carba NP(49). El Blue Carba Test método resultó el más sensible (100%), sin embargo, no el más específico para MBL (98.5%). En el año 2013, cuando J.Pires y colaboradores (Portugal) presentan el método, indican que éste presentaba una sensibilidad y especificidad de 100% para la detección de carbapenemasas(42). Posteriormente, en el año 2015, Fernando Pasteran y colaboradores (Argentina) hallan una sensibilidad de 97% y una especificidad de 100%(43). La especificidad de 98.5% obtenida en nuestro estudio se debió a la presencia de un falso positivo (*K.pneumoniae* KPC). Este resultado, al igual que el Test de Hodge modificado, se debe a que son pruebas de screening para carbapenemasas. La ventaja del Blue Carba Test radica en el tiempo de lectura, el cual no excede las dos horas y que en muchos casos se puede hacer la lectura a partir de los 15 minutos de reacción. La desventaja con este método es la dificultad en el preparado de la Solución, ya que es crítico el pH 7.0 antes de realizar la prueba(42, 45).

De los cinco métodos fenotípicos estudiados, el Método de discos combinados con inhibidor y el Test de sinergia de doble disco demostraron ser los más específicos (100%) y el Blue Carba Test el más sensible (100%). La principal ventaja del método de discos combinados con inhibidor (EDTA) es la existencia de un punto de corte claro como criterio, lo que confiere objetividad al momento de la interpretación de los resultados (38, 40). Por el contrario, la mayor desventaja de la prueba de sinergia de doble disco es la subjetividad en la interpretación de los resultados, en muchos casos es necesario repetir la prueba para evitar falsos negativos(36). Para

la interpretación de la prueba de Sinergia de doble disco se requiere de pericia por parte del personal a cargo (38). El Blue Carba Test y ambos Test de Hodge modificados, a pesar de su buena especificidad y sensibilidad, son métodos usados como screening para la detección de carbapenemasas, por lo que es necesario complementar el estudio con métodos específico para MBL(21).

CAPITULO V. CONCLUSIONES

- Los cinco métodos presentaron un buen desempeño para la detección de MBL (Tabla 2, gráfico N°1).
- Se ha encontrado como métodos más específicos (100%) a la Prueba de sinergia de doble disco y a la prueba de discos combinados con inhibidor; sin embargo, este último presenta una ventaja por su fácil lectura e interpretación. El método de Sinergia de doble disco requiere de personal entrenado para la interpretación de los resultados.
- El método más sensible (100%) fue el Blue Carba Test.
- En referencia al disco de EDTA, se encontró una concordancia perfecta (Tabla 2) entre los discos preparados in-house respecto a los discos comerciales. Sin embargo, el uso de disco de EDTA 0.5M (750ug) muestra dificultades en la lectura por presentar un halo de inhibición propio.
- El uso de discos de CAZ ayudó en la interpretación de resultados en la prueba de sinergia de doble disco, sin embargo, no es recomendado por su baja especificidad en la detección de MBL(34).
- El Test de Hodge modificado con la cepa indicadora *K. pneumoniae* ATCC 700603 presentó un desempeño similar respecto al Test de Hodge modificado con la cepa indicadora *E. coli* ATCC 25922. Al desarrollarse el método se obtuvo una mejor interpretación de los resultados al usarse una dilución 1/10 de la suspensión 0.5 McFarland de la muestra problema.
- El Blue Carba Test además de ser método más sensible (100%) es el más rápido respecto a los demás. Los resultados se pueden obtener a las 2 horas y en muchos casos a partir de los 15 minutos se puede visualizar la reacción. La dificultad de este método se encuentra en el preparado de la solución madre, específicamente en el ajuste a pH 7.0, lo que involucra además la necesidad de contar con un potenciómetro.

- El Test de Hodge modificado (*K. pneumoniae* o *E. coli*) y el Blue Carba Test presentaron un resultado Falso Positivo (*K. pneumoniae* KPC) debido a que son métodos fenotípicos para la detección de carbapenemasas, por lo que es necesario complementar el estudio con métodos específicos para MBL.

CAPITULO VI. RECOMENDACIONES

- La implementación de un método fenotípico para la detección de MBL en los laboratorios clínicos de rutina.
- El método debe ser elegido según costo-beneficio de acuerdo a las características de la cepa MBL prevalente, a pesar de que los cinco métodos estudiados presentan un buen desempeño para la detección de estos.
- El uso de discos de EDTA-in house; ya que se observó una concordancia perfecta respecto al comercial (Tabla 2) y su estabilidad es de 12 semanas a 4°C y 16 semanas a -20°C, según lo reportado por Yong y colaboradores (37).
- La dilución 1/10 de la cepa indicadora 0.5 McFarland para el desarrollo del Test de Hodge modificado, debido a que permite una mejor visualización e interpretación de los resultados.
- La implementación del Blue Carba, como método más rápido (2horas) para el reporte de sospecha de carbapenemasas, considerando el pH 7.0 de la solución madre como crítico para el desarrollo del mismo.
- Capacitación constante del personal además de los recursos necesarios que garantice el desarrollo de los procedimientos microbiológicos y el análisis fiable de los resultados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

1. Calvo J CR, Fernández F, Mirelis B, Navarro F. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos. In: Cercenado E CR, editor. *Procedimientos en Microbiología Clínica Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2da ed. ed2011.
2. Labarca L J, Araos B R. Resistencia antimicrobiana: Problema en aumento y soluciones escasas. *Revista chilena de infectología*. 2009;26:8-9.
3. Nordmann P. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: Overview of a major public health challenge. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 2014;44(2):51-6.
4. Glasner C, Albiger B, Buist G, Tambic Andrasevic A, Canton R, Carmeli Y, et al. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe: a survey among national experts from 39 countries, February 2013. *Euro Surveill*. 2013;18(28).
5. Ambler RP. The Structure of β -Lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 1980;289(1036):321-31.
6. Rasmussen BA, Bush K. Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1997;41(2):223-32.
7. Bebrone C. Metallo- β -lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochemical Pharmacology*. 2007;74(12):1686-701.
8. Kuwabara S, Abraham EP. Some properties of two extracellular beta-lactamases from *Bacillus cereus* 569/H. *Biochemical Journal*. 1967;103(3):27C-30C.
9. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, et al. Cloning and Characterization of bla(VIM), a New Integron-Borne Metallo- β -Lactamase Gene from a *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1999;43(7):1584-90.
10. Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones RN, et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2002;50(5):673-9.
11. Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR. Molecular Characterization of a β -Lactamase Gene, bla(GIM-1), Encoding a New Subclass of Metallo- β -Lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004;48(12):4654-61.
12. Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier J-D, et al. Novel Acquired Metallo- β -Lactamase Gene, bla(SIM-1), in a Class 1 Integron from *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates from Korea. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005;49(11):4485-91.
13. Yong D, Toleman MA, Bell J, Ritchie B, Pratt R, Ryley H, et al. Genetic and Biochemical Characterization of an Acquired Subgroup B3 Metallo- β -Lactamase Gene, bla(AIM-1), and Its Unique Genetic Context in *Pseudomonas aeruginosa* from Australia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2012;56(12):6154-9.
14. Sekiguchi J-i, Morita K, Kitao T, Watanabe N, Okazaki M, Miyoshi-Akiyama T, et al. KHM-1, a Novel Plasmid-Mediated Metallo- β -Lactamase from a *Citrobacter freundii* Clinical Isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2008;52(11):4194-7.
15. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, et al. Characterization of a New Metallo- β -Lactamase Gene, bla(NDM-1), and a Novel Erythromycin Esterase Gene

- Carried on a Unique Genetic Structure in *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 14 from India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009;53(12):5046-54.
16. Poirel L, Rodríguez-Martínez J-M, Al Naiemi N, Debets-Ossenkopp YJ, Nordmann P. Characterization of DIM-1, an Integron-Encoded Metallo- β -Lactamase from a *Pseudomonas stutzeri* Clinical Isolate in the Netherlands. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010;54(6):2420-4.
 17. Salabi AE, Toleman MA, Weeks J, Bruderer T, Frei R, Walsh TR. First Report of the Metallo- β -Lactamase SPM-1 in Europe. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010;54(1):582-.
 18. Pollini S, Maradei S, Pecile P, Olivo G, Luzzaro F, Docquier J-D, et al. FIM-1, a New Acquired Metallo- β -Lactamase from a *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolate from Italy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2013;57(1):410-6.
 19. Gonzales-Escalante E, Vicente-Taboada W, Champi-Merino R, Soto-Pastrana J, Flores-Paredes W, Lovera-Garcia M, et al. [Metallo-ss-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Lima, Peru]. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2013;30(2):241-5.
 20. Corso A, Guerriero L, Pasterán F, Ceriana P, Callejo R, Prieto M, et al. Capacidad de los laboratorios nacionales de referencia en Latinoamérica para detectar mecanismos de resistencia emergentes. *Revista Panamericana de Salud Pública*. 2011;30:619-26.
 21. Institute. CaLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fifth informational supplement. CLSI document M100–S25. 2015.
 22. Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fujiwara H, et al. Convenient Test for Screening Metallo- β -Lactamase-Producing Gram-Negative Bacteria by Using Thiol Compounds. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000;38(1):40-3.
 23. Martínez-Martínez L, Calvo J. Desarrollo de las resistencias a los antibióticos: causas, consecuencias y su importancia para la salud pública. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2010;28(Supl.4):4-9.
 24. Washington C. Winn SDA, William M. Janda, Elmer W. Koneman, Gary W. Procop, Paul C. Schrenckenberger, Gail L. Woods. Koneman. *Diagnóstico Microbiológico*. 6ª ed 2008.
 25. Henry JB. Henry el laboratorio en el diagnóstico clínico: homenaje a Todd-Sanford & Davidsohn: Marbán; 2005.
 26. Rossi Flávia BAD. Resistencia bacteriana: interpretando el antibiograma 2006.
 27. Bush K, Jacoby GA. Updated Functional Classification of β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010;54(3):969-76.
 28. Livermore DM. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. 1995;8(4):557-84.
 29. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo- β -Lactamases: the Quiet before the Storm? *Clinical Microbiology Reviews*. 2005;18(2):306-25.
 30. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20(3):440-58, table of contents.
 31. Gonzales E. DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE METALO- β -LACTAMASAS EN AISLAMIENTOS DE *Pseudomonas aeruginosa* RECUPERADOS EN UN INSTITUTO ESPECIALIZADO PEDIATRICO DE LIMA-PERU. Lima - Perú: UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS; 2013.
 32. Gonzales E. DETECCION Y CARACTERIZACION MOLECULAR DE METALO- β -LACTAMASAS EN AISLAMIENTOS DE *Pseudomonas aeruginosa* RECUPERADOS EN EL INSTITUTO NACIONAL DE SALUD DEL NIÑO LIMA-PERU. 2013.

33. Gonzales-Escalante E. Metallo- β -lactamasas: ¿el fin de los β -lactámicos? Gonzales-Escalante, Edgar Metallo--lactamasas: ¿el fin de los -lactámicos? Revista Peruana de Epidemiología, vol 16, núm 3, septiembre-diciembre, 2012, pp 01-08 Sociedad Peruana de Epidemiología Lima, Perú [Internet]. 2012; 16:[01-8 pp.]. Available from: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=203125431002>.
34. Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum JH. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo- β -lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clinical Microbiology and Infection*. 2001;7(2):88-91.
35. Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y. Evaluation of the Hodge Test and the Imipenem-EDTA Double-Disk Synergy Test for Differentiating Metallo- β -Lactamase-Producing Isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003;41(10):4623-9.
36. Oh E-J, Lee S, Park Y-J, Park JJ, Park K, Kim S-I, et al. Prevalence of metallo- β -lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in a Korean University hospital and comparison of screening methods for detecting metallo- β -lactamase. *Journal of Microbiological Methods*. 2003;54(3):411-8.
37. Yong D, Lee K, Yum JH, Shin HB, Rossolini GM, Chong Y. Imipenem-EDTA Disk Method for Differentiation of Metallo- β -Lactamase-Producing Clinical Isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002;40(10):3798-801.
38. Behera B, Mathur P, Das A, Kapil A, Sharma V. An evaluation of four different phenotypic techniques for detection of metallo- β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 2008;26(3):233-7.
39. Perozo M, Armindo J, Castellano González MJ, Ling Toledo E, Arraiz N. Detección fenotípica de metalobetalactamasas en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. *Kasmera*. 2012;40:113-21.
40. Yan JJ, Wu JJ, Tsai SH, Chuang CL. Comparison of the double-disk, combined disk, and Etest methods for detecting metallo-beta-lactamases in gram-negative bacilli. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2004;49(1):5-11.
41. Pasteran F, Veliz O, Rapoport M, Guerriero L, Corso A. Sensitive and Specific Modified Hodge Test for KPC and Metallo-Beta- Lactamase Detection in *Pseudomonas aeruginosa* by Use of a Novel Indicator Strain, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011;49(12):4301-3.
42. Pires J, Novais A, Peixe L. Blue-carba, an easy biochemical test for detection of diverse carbapenemase producers directly from bacterial cultures. *J Clin Microbiol*. 51. United States2013. p. 4281-3.
43. Pasteran F, Veliz O, Ceriana P, Lucero C, Rapoport M, Albornoz E, et al. Evaluation of the blue-carba test for rapid detection of carbapenemases in gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol*. 53. United States2015. p. 1996-8.
44. Servicio Antimicrobianos, Laboratorio Nacional de Referencia en Antimicrobianos INEI-ANLIS "Dr.Carlos G.Malbrán". BLUE CARBA - Detección rápida de carbapenemasas directo de placas de cultivo. 2014.
45. Pasteran F, Rapoport M, Lucero C, Corso A. Comparison of the in-house Blue-Carba Test (BCT) with the Rapid CARB Blue Kit for the Detection of Carbapenemase-Producing Gram Negative Bacilli. 25th ECCMID; Copenhagen, Denmark2015.

46. Franklin C, Liolios L, Peleg AY. Phenotypic detection of carbapenem-susceptible metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacilli in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol.* 2006;44(9):3139-44.
47. Galani I, Rekatsina PD, Hatzaki D, Plachouras D, Souli M, Giamarellou H. Evaluation of different laboratory tests for the detection of metallo-beta-lactamase production in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61(3):548-53.
48. Hodge W, Ciak J, Tramont EC. Simple method for detection of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol.* 1978;7(1):102-3.
49. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid identification of carbapenemase types in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp. by using a biochemical test. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(12):6437-40.

ANEXOS

INDICE DE ANEXOS

ANEXO

- A. Hoja de recolección de datos.
- B. Tabla de muestras, especies bacterianas, referencias y metodología.
- C. Tabla de resultados – muestras positivas

ANEXO A
HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

N° de Muestra:.....

Especie bacteriana:.....

Perfil de resistencia (gen):.....

Título del estudio:.....

Autor(es):.....

ANEXO B

TABLA DE MUESTRAS, ESPECIES BACTERIANAS, REFERENCIAS Y METODOLOGÍA

Aislamientos (n=100)	No. De aislamientos	Fuente o referencia	Metodología	Gen	Primer	Secuencia 5´-3´
Productores de MBL (n=32)						
<i>P.aeruginosa</i>						
IMP	5	E.Gonzales 2013	Multiplex PCR	gen <i>bla</i> IMP	IMP-F	GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC
	22	E.Gonzales 2013	Multiplex PCR	gen <i>bla</i> IMP	IMP-R	CCAAACYACTASGTTATCT
VIM	2	E.Gonzales 2013	Multiplex PCR	gen <i>bla</i> VIM	VIM-F VIM-R	GATGGTGTTTGGTCGCATA CGAATGCGCAGCACCAG
<i>Klebsiella pneumoniae</i>						
VIM	1	PEEC - 2013	Información no brindada			
<i>Providencia sp.</i>						
NDM	1	INEI-ANLIS*	PCR	gen <i>bla</i> NDM	NDM-F	AGCACACTTCCTATCTCGAC
<i>P.mirabilis</i>				gen <i>bla</i> NDM	NDM-R	GGCGTAGTGCTCAGTGTC
NDM	1	INEI-ANLIS*	PCR			

MBL, metalobetalactamasas. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI) - ANLIS "DR. CARLOS G. MALBRAN". PEEC, Programa de Evaluación Externa de la calidad.

*Aislamientos confirmados por INEI-ANLIS

ANEXO C

TABLA DE RESULTADOS – MUESTRAS MBL POSITIVAS

N° Muestra	Sinergia de doble disco		Discos combinados con inhibidor	MHT <i>E.coli</i> ATCC 25922	MHT <i>K.pneumoniae</i> ATCC 100603	Blue Carba Test
	EDTA comercial	EDTA in-house				
1	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
2	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
3	positivo	positivo	positivo	negativo	negativo	positivo
4	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
5	positivo	positivo	positivo	negativo	negativo	positivo
6	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
7	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
8	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
9	positivo	positivo	positivo	negativo	negativo	positivo
10	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
11	negativo	negativo	positivo	positivo	positivo	positivo
12	positivo	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo
13	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
14	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
15	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
16	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
17	positivo	positivo	negativo	positivo	positivo	positivo
18	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
19	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo

20	positivo	positivo	negativo	positivo	positivo	positivo
21	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
22	positivo	positivo	negativo	positivo	positivo	positivo
23	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
24	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
25	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
26	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
27	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
28	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
29	positivo	positivo	positivo	negativo	negativo	positivo
30	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
31	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
32	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
TOTAL	31/32	31/32	28/32	28/32	27/32	32/32
